第 24 卷 第 4 期　　昆 虫 学 报　　Vol. 24, No. 4
1981 年 11 月　　ACTA ENTOMOLOGICA SINICA　　Nov., 1981

金龟幼虫血细胞的防卫反应

杨 明 华
（中国科学院动物研究所）

摘要　在铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* Mots. 和华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* F. 3 龄幼虫体内注射标准剂量的日本金龟岬芽孢杆菌 *Bacillus popilliae*，观察 24 小时内血细胞的反应。结果表明，昆虫种类不同，血细胞反应的方式也不相同。在敏感虫种铜绿丽金龟中，只有少数个体能在体腔内形成以浆血胞为主的黑核型囊状体；而在不敏感虫种华北大黑鳃金龟幼虫体腔内，大多数个体能形成以珠血胞为主的块状囊状体。血细胞囊状体的形成率大体上同注射感染率相吻合。本文还讨论了囊状体的形成过程及其作用机制。

前　　言

关于昆虫血细胞的防卫反应，国内外已有许多报道（Metchnikoff, 1884; Metalnikov, 1927; Salt, 1970; Whitcomb 等，1974; Nappi, 1975）。大多数作者认为，无论是人工注射感染，或是自然感染，昆虫血细胞都会对入侵微生物作出相应的反应。细胞囊状体的形成是昆虫免疫系统中的一个重要的组成部分，主要涉及寄主血细胞对外来微生物或其他寄生物的包围凝聚和由此产生的多细胞层的鞘状结构。最近几年，对囊状体的结构和功能等方面作了较多的研究（Hoffmann 等，1974; Zachary 等，1975; Ratcliffe 等，1977）。但是由于使用虫种和微生物种类不同，甚至取样时间不同，因而使这些结果无法归纳比较，甚至有人对囊状体能否对微生物起到抑止作用持有异议。本文选用两种对日本金龟岬芽孢杆菌具有不同感染力的金龟岬幼虫，观察囊状体形成的全过程，并在此基础上讨论囊状体的作用机制。

材 料 与 方 法

虫种　在北京郊区采集铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta* Mots.（以下简称铜绿）和华北大黑鳃金龟 *Holotrichia oblita* F.（以下简称大黑）3 龄幼虫。在室内 20℃ 恒温条件下饲养 3 周后，选健壮的个体进行注射试验。

菌种　选用日本金龟岬芽孢杆菌 *Bacillus popilliae* Dutky 多次注射证明，该菌对铜绿有较强的致病力，而对大黑则不感染。

注射方法　将血涂片上的芽孢用蒸馏水洗脱，以 4000 转/分离心 20 分钟，共三次。用重蒸水制成 10^6/毫升芽孢的悬浮液。幼虫体表用 70% 酒精消毒后，用微量注射器在腹部倒数第二节侧面进行注射，每头 5 微升。对照幼虫注射同量的 Clarke 生理盐水。将幼虫置于 28℃ 恒温下继续饲养。

本文于 1980 年 5 月收到。

组织学观察 幼虫在注射后5分钟、15分钟、0.5、1、2、4、6、12和24小时，每次取样2头，重复2次，解剖观察体腔中的囊状体形成情况。解剖前先将幼虫投于80℃热水中5分钟，待冷却后置于4℃的 Clarke 生理盐水中解剖。在解剖镜下，用镊子取出体腔中的凝块，并立即投人 Bouin 固定液，固定12—24小时（根据组织块的大小而定），酒精脱水，石蜡包埋，切片厚度为4—5微米。经 Giemsa 染色后，用 Zeiss 显微镜拍摄照片。

结 果

在幼虫体腔内注射了日本金龟蚲芽孢杆菌之后，立即引起各类血细胞的凝集反应。本文采用肉眼解剖和组织学观察相结合的方法，弄清参与反应的血细胞种类及囊状体形成的过程。根据 Price (1974) 的分类法，将昆虫血细胞粗分为原血胞、浆血胞、颗粒血胞、珠血胞、囊血胞和类绛血胞六种。

1. 解剖观察 对注射后的幼虫体腔进行解剖，5分钟后多数幼虫体内都有直径0.5—2毫米的凝块，数量不等，多的7—8个，少的2—3个。大部分凝块附着于注射一侧的脂肪体上，少数附着在肠道和气管壁上。半小时之内“大黑”的凝块呈紫罗兰色，然后中间变成黑色；“铜绿”的凝块少数是黑色，多数较透明。对照幼虫体内也形成凝块，外形像成串的蛙卵，但2小时后逐渐消失。

2. 组织学观察 幼虫注射芽孢后不同时间内所形成的凝块进行了简单的对比，见表1。不是所有的凝块中都有囊状体。就铜绿而言，只有注射5分钟后的凝块中有黑核型囊状体（图版 I:7）占整个感染试验的15%左右。大黑幼虫体腔内多数能找到块状囊状体（图版 I:8），说明该虫体腔内的血细胞对芽孢的反应能力比前者强。

表1 囊状体形成状况

注射后取样时间	分钟			小时					
	5	15	30	1	2	4	6	12	24
铜绿丽金龟	+	○	○	−	−	−	−	−	−
大黑鳃金龟	+	+	+	+	+	○	+	+	+

+ 有囊状体 − 无囊状体 ○ 未见芽孢和血细胞

铜绿幼虫体腔内的黑核型囊状体是在注射芽孢后1—5分钟之内迅速形成的。可以在同一个取样时间，从不同的凝块中看到不同发育阶段的囊状体结构。在注射后的最初阶段，血细胞和芽孢均处在游离状态（图版 I:1）；两者发生接触后，使许多浆血胞很快地向有芽孢的地方集中并将芽孢包围起来（图版 I:2,3）。浆血胞的数量增多时，位于中间者开始部分裂解并出现黑化（melanization）（图版 I:4, 5）。随着中心黑核的增大，浆血胞越来越多，通常出现5—6层（图版I:7），它们的形状从圆形变成扁平形。这种囊状体继续吸附浆血胞，最终形成直径大约为100—120微米的黑核型囊状体，其中心的黑核要占总面积的1/5左右（图版 I:7）。通常在黑核里已看不清被包围的芽孢。

大黑幼虫的反应不同，其块状囊状体由珠血胞、颗粒血胞和浆血胞混合组成，它们借助于某种基质互相粘附在一起，没有固定的结构（图版 I:8，9）。囊块直径平均为260—

300 微米。尽管血细胞和芽孢共同凝聚在一起，但在 24 小时内并未发现血细胞的裂解和产生黑化。在珠血胞的周围有晕环状的分泌物(图版II:11，12)，芽孢位于其中，表明这类血细胞是通过某种分泌物将芽孢粘附住的。个别浆血胞内包含有芽孢（图版II:10)，表明它具有吞噬能力。

在大多数铜绿幼虫体内没有发现黑核型的囊状体，被注射的游离的芽孢大多附着在脂肪体上。在 2 小时及 12 小时的组织切片中，有时可以看到这些芽孢发生明显膨胀（图版 II:13)，或失去折光开始萌发(图版 II:14)。但是在大黑幼虫体内，芽孢往往和血细胞凝聚在一起，大部分形成了块状囊状体，在24小时内未曾发现芽孢萌发。

讨　　论

血细胞的吞噬作用和囊状体的形成是无脊椎动物普遍的防卫反应。根据报道，有许多昆虫的血细胞对病原细菌和非病原细菌都会产生强烈的吞噬作用或形成囊状体（Nappi, 1975; Peter, 1978)。本文试验说明，同一科不同种的昆虫其血细胞囊状体的类型有所区别。以日本金龟蚆芽孢杆菌做病原细菌，铜绿幼虫体内形成的是黑核型囊状体；大黑形的是块状囊状体；而四纹丽金龟幼虫还可以形成体液囊状体（杨明华，1980)。这种在结构上的差异是否同每一种昆虫的血细胞种类有关，是值得进一步研究的。在正常情况下，这些昆虫都具有浆血胞、颗粒血胞和珠血胞等，但因虫种不同，它们的数量、比例和形态都有差异。铜绿以浆血胞和颗粒血胞为主，个体都比较小（图版 I:1)；大黑以珠血胞和颗粒血胞为主，而个体都比较大（图版 II：9)。其次，在血细胞囊状体形成过程中，每种血细胞的作用也不相同。Ratcliffe（1976）曾将蜡状芽孢杆菌注射到大蜡螟幼虫体内，发现最初是颗粒血胞吐出絮状物，并将细菌粘附住，然后再引来数量较多的浆血胞，经过黑化作用，最后形成囊状体。在本试验中发现大黑的珠血胞能吐出絮状物，但未见黑化作用。可见，每一种昆虫由于血细胞的种类不同，对病原微生物的反应也是有差异的。

铜绿和大黑 3 龄幼虫对日本金龟蚆芽孢杆菌显示出不同的感染率。前者的注射感染率一般为 80% 左右，在注射后的 1—12 天中将幼虫前足放血镜检，大多数可看到游离的芽孢和营养体，在大量的组织切片中仅发现少数虫体有囊状体，表示铜绿的血细胞防卫反应比较差；而后者注射芽孢后几乎是不感染，放血镜检时未曾看到游离的芽孢和营养体，但是在组织切片中，可看到许多块状的囊状体，发现芽孢和血细胞凝集在一起，这表明大黑的血细胞对芽孢有较强的凝集作用。因此囊状体形成的多寡也能反应出该病原对昆虫致病力的强弱。

有些昆虫在形成囊状体的时候，会产生黑色素，但是其作用至今仍然不十分清楚。Nappi（1975）认为，某些昆虫的血细胞与病原体接触时会自行裂解，导致血淋巴中的酪氨酸和多巴等物质的代谢发生改变，在酚氧化酶的作用下，形成了黑色素，这种黑色素起到一种不渗透的栅栏作用，阻止微生物和血淋巴之间代谢物质的交换。但是在本试验中除了少数铜绿囊状体产生黑色素以外，大黑幼虫体内的囊状体仅是血细胞和芽孢组成的凝块，未发现血细胞裂解和形成黑色素。这种血细胞防卫反应却显示出寄主对病原有更强的免疫力。因此进一步研究大黑幼虫的血细胞对病原菌抑制作用是很有意义的。

参 考 文 献

杨明华 1981 昆虫的防卫反应。昆虫知识 **18**(3): 117—9。

Hoffmann, D., M. Brehelin and J. A. Hoffmann, 1974 Modifications of the hemogram and hemocytopoietic tissue of male adults of *Locusta migratoria* (Orthoptera) after injection of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr Pathol.* **24**: 238—47.

Metalnikov, S. 1927 "L'Infection Microbienne et l'Immunité chez la Mite des Abeilles *Galleria mellonella*," 140pp., *Monogr. Inst. Pasteur. Masson* et Cie., Paris.

Metchnikoff, D. E. 1884 Über eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien: Beitrag zur Lehre uber den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger. Virchows Arch., **96**: 177—95.

Nappi, A. J. 1975 In Invertebrate Immunity (eds. K. Maramorosch and R. E. Shope), pp. 293—326. Academic Press, New York.

Peter Y. K., E. A. Cheung, M. D. Grula and R. L. Burton. 1978 Hemolymph responses in *Heliothis zea* to Inoculation with *Bacillus thuringiensis* or *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Invertebr. Pathol.* 31: 148—56.

Price, C. D. and N. A. Ratcliffe 1974 A reappraisal of insect hemocyte classification of blood from fifteen insect orders. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, **147**: 537—49.

Ratcliffe, N. A. and S. J. Gagen. 1976 Cellular defence reaction of insect hemocytes *in vivo*: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J. Invertebr. Path.* **28**: 373—82.

Ratcliffe, N. A. and S. J. Gagen, 1977 Studies on the *in vivo* cellular reactions of insects: An ultrastructural analysis of nodule formation in *Galleria mellonella*, *Tissue & Cell* **9**(1): 73—85.

Salt, G. 1970 "The cellular defence reactions of insects," 118pp., *Cambridge Monographs in Experimental biology* No. 16. Cambridge University Press, London, New York.

Whitcomb, R. F., M. Shapiro. and R. R. Granados, 1974 Insect defense mechanisms against microorganisms and parasitiods. In "The physiology of Insecta" (M. Rockstein, ed) Vol. V, pp. 447—536. Academic Press, New York.

Zachary, D., M. Brehelin and J. S. Hoffmann. 1975 Role of the 'thrombocytoids' in capsule formation in the dipteran *Calliphora erythrocephala*. *Cell Tiss. Res.*, **162**: 343—8.

THE CELLULAR DEFENSE REACTIONS OF WHITE GRUB HEMOCYTES

YANG MING-HUA
(*Institute of Zoology, Academia Sinica*)

The third instar larvae of *Anomala corpulenta* and *Holotrichia oblita* were injected with a standardized dose of spores of *Bacillus popilliae* Dutky, and the reactions of hemocytes were examined during the first 24 hours after the injection. Agglomerates of hemocytes were formed in all the injected larvae and they attached to the fat body and internal surfaces of the body cavity.

In the more susceptible larvae of *Anomala corpulenta,* hemocytes formed clumps and the cells underwent lysis to yield the melanian acellular substance. The necrotising masses may become encapsulated by plasmatocytes to form capsules with black cores within 5 min., althouth this encapsulation occurred around a few agglomerates. In the nonsusceptible larvae of *Holotrichia oblita,* most of clumps consisted of spherule hemocytes, granular hemocytes and plasmatocytes and the bacteria. The initial aggregetion stage was very rapid, occurring within 5 min., and it was brought about by the release of an adhesive flocculent material by the spherule hemocytes in contact with the bacteria. Within 24 hours, we did not found any hemocyte lysis and melanization.

The result shows that the responses of the hemocytes of *Anomala corpulenta* and *Holotrichia oblita* to the pathogenic *Bacillus* can give indication of their natural infective rates, and that encapsulation and clump formation can effectively prevent the development of the bacterial spores.

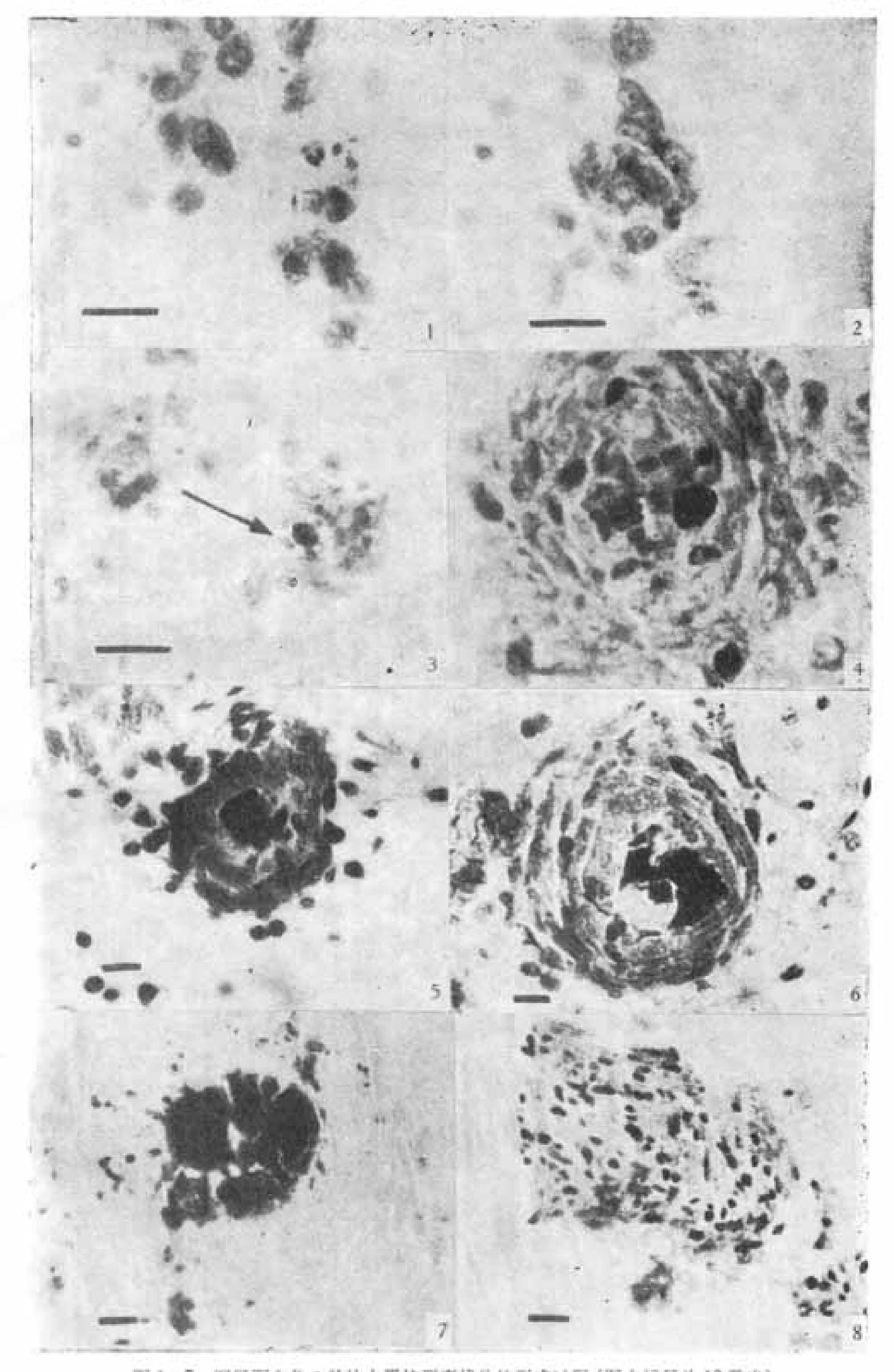


图 1—7　铜绿丽金龟 3 龄幼虫黑核型囊状体的形成过程（图中标尺为 10 微米）

1．游离的浆血胞和芽孢　2．浆血胞迅速地向芽孢靠拢　3．浆血胞将芽孢包围　4．血细胞进一步集结，中间产生黑色素　5．黑色素增多，形成核心　6．沿黑核四周的浆血胞变成扁平状，有 4—5 层血细胞　7．注射 5 分钟以后的黑核型囊状体。

图 8　大黑鳃金龟幼虫的块状囊状体，该图标尺为 20 微米。

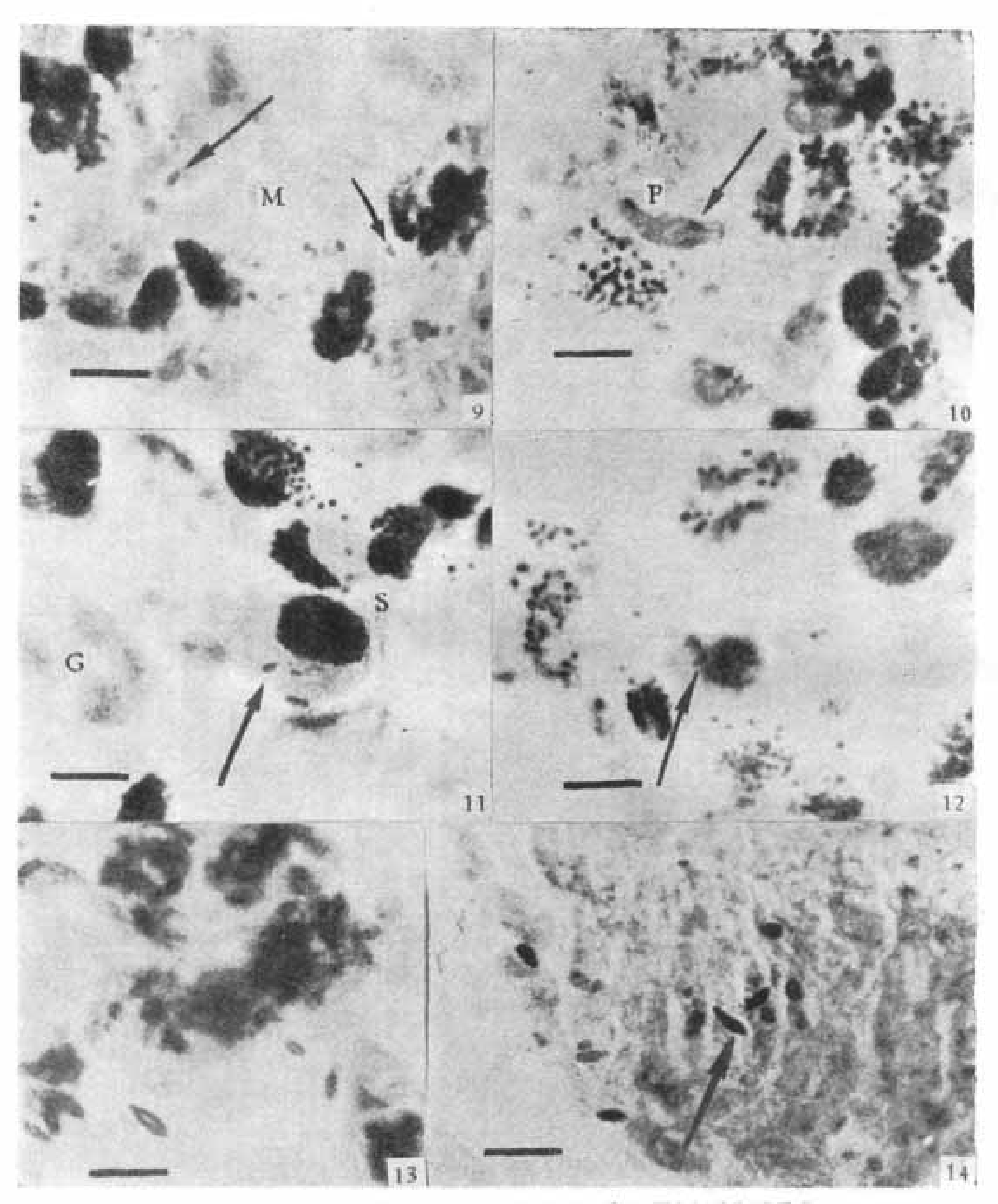


图 9—12　大黑鳃金龟幼虫体内的块状囊状体之部分放大，图中标尺为 10 微米。

P. 浆血胞　G. 颗粒血胞　S. 珠血胞　M. 块状囊状体中的基质，箭头示芽孢　9. 注射 15 分钟后的块状囊状体，芽孢在血细胞之间　10. 注射 6 小时后的囊状体，浆血胞中有芽孢　11、12. 在 24 小时后的囊状体中，珠血胞四周有晕状的分泌物，将芽孢粘附住

图 13　注射 2 小时后，在铜录幼虫血淋巴中的游离芽孢明显膨胀。

图 14　注射 12 小时，铜录幼虫血淋巴中的芽孢萌发（箭头所示）。